

反相高效液相色谱-化学发光法测定复合维生素片剂中的维生素 B₁ 和 B₂

张琰图, 章竹君, 杨维平, 田穗康

(陕西师范大学化学与材料科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要 基于水溶性维生素在碱性介质中只有维生素 B₁(VB₁)和维生素 B₂(VB₂)可以被 K₃Fe(CN)₆ 直接氧化产生化学发光的原理,建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离柱后化学发光检测 VB₁ 和 VB₂ 的新方法,并成功应用于复合维生素 B 片剂中 VB₁ 和 VB₂ 的测定。该方法测定 VB₁、VB₂ 的线性范围分别为 1.0×10⁻³~1.0 g/L 和 1.0×10⁻³~0.1 g/L,检出限分别为 2×10⁻⁴ g/L 和 8×10⁻⁴ g/L。对 1.0×10⁻² g/L VB₁、VB₂ 溶液连续 11 次测定的相对标准偏差分别为 2.8%、0.9%。

关键词 高效液相色谱;化学发光;铁氰化钾;维生素 B₁;维生素 B₂

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2003)04-0391-03

Determination of Thiamine and Riboflavin by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection

ZHANG Yantu, ZHANG Zhujun, YANG Weiping, TIAN Suikang

(College of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: Based on the direct chemiluminescence reaction of thiamine (VB₁) and riboflavin (VB₂) with hexacyanoferrate (III) in sodium hydroxide medium, a novel high performance liquid chromatography (HPLC)-chemiluminescence (CL) detection method for simultaneous determination of VB₁ and VB₂ was developed. The proposed method has been applied satisfactorily to the determination of VB₁ and VB₂ in a pharmaceutical preparation. The chemiluminescence intensity was linear with VB₁ and VB₂ concentrations in the ranges of 1.0×10⁻³ - 1.0 g/L and 1.0×10⁻³ - 0.1 g/L, respectively. The limits of detection (LOD) for VB₁ and VB₂ were 2×10⁻⁴ g/L and 8×10⁻⁴ g/L, respectively. The relative standard deviations (RSD) (n = 11) were 2.8% for 1.0×10⁻² g/L VB₁, and 0.9% for 1.0×10⁻² g/L VB₂.

Key words: high performance liquid chromatography; chemiluminescence; hexacyanoferrate (III); thiamine; riboflavin

维生素 B₁(VB₁, thiamine)、维生素 B₂(VB₂, riboflavin)是人们生活中必需的营养要素,是一些具有调节和控制新陈代谢过程作用的生物活性物质,是复合维生素的主要成分。VB₁与糖代谢有密切关系,缺乏时会使血、尿和神经组织中丙酮酸含量升高和得脚气病。VB₂的生理功能是作为辅酶,参与氧化作用,缺乏时会使皮肤、眼睛与神经系统损伤。

化学发光分析法(CL)具有灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单等优点,加上高效液相色谱(HPLC)具有高效分离的特性,使得 HPLC-CL 法成为一种有效的痕量及超痕量分析技术,越来越受到

人们的青睐^[1-3]。VB₁和VB₂的化学发光分析已有过报道^[4-8],但这些方法中往往存在相互干扰。有人曾用 HPLC 法分离荧光检测 VB₁和VB₂,但分离前需萃取和酶解,操作繁冗^[9]。到目前为止,未见有采用 HPLC 法分离化学发光法检测 VB₁和VB₂的报道。研究发现,在 NaOH 碱性介质中,不使用任何发光试剂,在所有水溶性维生素中只有 VB₁和VB₂能被 K₃Fe(CN)₆ 直接氧化产生化学发光,据此,设计了用反相 HPLC 直接分离和化学发光检测 VB₁和VB₂的新方法。由于共存的多种其他维生素均不干扰测定,本法成功地应用于复合维

收稿日期 2002-09-30

作者简介 张琰图,男,1969年生,延安大学访问学者,讲师。

通讯联系人 章竹君,男,教授,博士生导师,电话(029)5308748, E-mail: zzy18@hotmail.com。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 20175039)。

生素 B 片剂中 VB₁ 和 VB₂ 含量的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱化学发光检测系统如图 1 所示。LC-6A 高效液相色谱仪(Shimadzu, Japan), 7125 型手动进样器(25 μL) (上海科学仪器厂), HL-2 恒流泵(上海青浦沪西仪器厂), 过滤器(大连江申分离科学技术公司), IFFL-D 型流动注射化学发光仪(西安瑞科电子有限公司), 整个分析过程中的实验数据采集及处理, 均由 Windows98 系统下 IFFL-D 软件(西安瑞科电子有限公司) 完成。

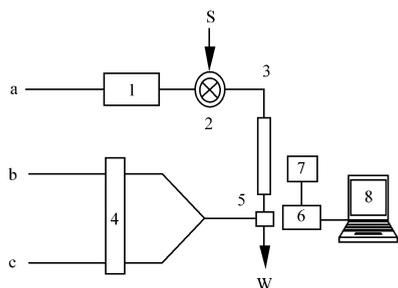


图 1 高效液相色谱-化学发光检测系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of high performance liquid chromatography-chemiluminescence (HPLC-CL) detection system

a. mobile phase ; b. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ solution ; c. NaOH solution ; S. sample solution ; W. waste.

1. reciprocating pump ; 2. injector ; 3. HPLC column ; 4. peristaltic pump ; 5. chemiluminescence flow cell ; 6. photomultiplier tube (PMT) ; 7. high voltage supply ; 8. computer.

甲醇(色谱纯) (Fisher 公司), VB₁ 和 VB₂ (生化试剂, 上海化学试剂厂), 铁氰化钾、无水硫酸钠和氢氧化钠均为国产分析纯, 水为去离子石英亚沸蒸馏水。甲醇用 0.5 μm 滤膜过滤, 无水硫酸钠配成 0.1 mol/L 水溶液过滤后使用。准确称量 50.0 mg VB₁, 加适量水溶解, 然后定容于 50 mL 棕色容量瓶中, 即得 1.0 g/L 的储备液。VB₂ 储备液除需加适量 0.001 mol/L NaOH 溶解外其余均按上述方法配制。使用时用水逐级稀释至所需浓度。上述溶液配制好后, 贮存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。

1.2 色谱条件

Kromasil C₁₈ 柱(150 mm \times 4.6 mm i. d. , 5 μm) (The Nest Group 公司, USA)。流动相: 甲醇-0.1 mol/L Na₂SO₄ 水溶液(体积比为 20:80) 经过滤、超声脱气处理后使用。流速: 1.0 mL/min。进样量: 20 μL 。柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 操作步骤

按图 1 所示连接各部件, 将一根长为 10 cm 的无色玻璃管(内径为 2 mm, 外径为 3.5 mm) 加工缠绕成直径为 0.8 cm 的平面螺旋管作为流通池并将

其放置在光电倍增管前面。开启仪器, 使用恒流泵分别将 NaOH 和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液以 1.2 mL/min 的流速泵入分析系统。待基线平稳后, 用进样器将 20 μL 的标准液(或样品溶液) 注入色谱柱, 经色谱柱分离后与 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 碱性溶液混合, 在流通池中产生化学发光, 记录色谱图, 根据峰高进行定量分析。

2 结果与讨论

2.1 化学发光反应及色谱分离条件的选择

2.1.1 铁氰化钾浓度对化学发光强度的影响

在一定浓度范围内, 随 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度升高, 化学发光信号增强, 在 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度增大到一定程度后, 再增大其浓度, 发光信号反而降低。这可能是由于铁氰化钾本身有颜色, 可以吸收光辐射。本文以 VB₁ (1.0 $\times 10^{-2}$ g/L)、VB₂ (1.0 $\times 10^{-2}$ g/L) 为例, 在固定了流动相、碱浓度的条件下, 考察了不同浓度的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0 ~ 10⁻² mol/L) 对该化学发光反应的影响。结果表明, 当 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的浓度为 2 $\times 10^{-3}$ mol/L 时, 二者的发光强度最大。

2.1.2 氢氧化钠浓度对化学发光强度的影响

实验表明, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 只有在碱性介质中才能氧化 VB₁ 和 VB₂ 产生化学发光。在一定浓度范围内, 随 NaOH 浓度升高, 化学发光信号增强, 但 NaOH 浓度增大到一定程度后, 再增大其浓度, 发光信号反而略有降低。本文在固定了 VB₁ (1.0 $\times 10^{-2}$ g/L)、VB₂ (1.0 $\times 10^{-2}$ g/L) 流动相和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度的条件下, 考察了不同浓度的 NaOH (0 ~ 1.0 mol/L) 对该化学发光反应的影响。结果表明, NaOH 的浓度为 0.5 mol/L 时, 发光信号最大, 故 NaOH 的浓度选择为 0.5 mol/L。

2.1.3 硫酸钠浓度对化学发光强度的影响

流动相中加入 Na₂SO₄ 能有效改善 VB₁ 和 VB₂ 的分离度^[10]。本文在固定了 VB₁ (1.0 $\times 10^{-2}$ g/L)、VB₂ (1.0 $\times 10^{-2}$ g/L)、NaOH 和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度的条件下, 考察了不同浓度的 Na₂SO₄ (0 ~ 1.0 mol/L) 对该化学发光反应的影响。结果表明, 一定浓度范围内, 随 Na₂SO₄ 浓度的改变, 二者的化学发光强度几乎不受影响。参考文献 [10], 选择 Na₂SO₄ 浓度为 0.1 mol/L。

2.1.4 化学发光反应载体流速的影响

在流动注射化学发光分析中, 反应载体的流速是影响化学发光强度的一个重要因素。在固定 HPLC 流动相流速(1.0 mL/min) 及其他条件的情况下, 考察了 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 及 NaOH 的流速对该化学发光反应的影响。结果表明, 随着铁氰化钾及氢氧化钠流速的增大, 发光信号增大, 增大到一定程度

后,发光信号逐渐降低,反应载体流速选择为1.2 mL/min。

2.1.5 反应混合管的设计方式

在其他条件一定的情况下,柱后洗脱液与化学发光试剂混合后,化学发光强度与进入检测窗口的混合管长度有关^[11]。在考察混合管长度与化学发光强度的基础上,我们将柱后洗脱液与化学发光试剂在120°三通处汇合,并连接一透明螺旋玻璃管直接置于检测窗口内,取得了满意的效果。

2.1.6 甲醇对化学发光信号的影响

甲醇对化学发光反应有一定的抑制作用,随CH₃OH含量增多,化学发光信号降低。兼顾灵敏度和分离度的要求,本文选取体积比为20:80的CH₃OH-0.1 mol/L Na₂SO₄溶液为流动相。

2.2 色谱分离情况

在选定的上述实验条件下,得到VB₁和VB₂的色谱图,如图2所示。

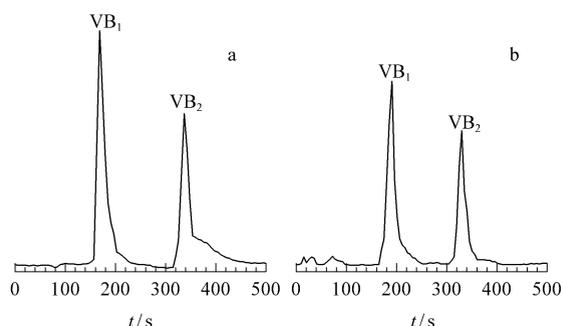


图2 维生素B₁、B₂混合标准品(a)及样品(b)的色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of a standard mixture of VB₁ and VB₂ (a) and sample (b)

2.3 线性范围和检出限

在选定的实验条件下,VB₁和VB₂的浓度分别在 $1.0 \times 10^{-3} \sim 1.0$ g/L和 $1.0 \times 10^{-3} \sim 0.1$ g/L内与发光强度成良好的线性关系。其标准曲线和部分测定参数列于表1。根据IUPAC规定,测得方法的检出限(3σ)分别为 2×10^{-4} g/L和 8×10^{-4} g/L。对 1.0×10^{-2} g/L的VB₁和VB₂进行11次测定,相对标准偏差(RSD)为2.8%及0.9%。

表1 方法的线性参数($n=11$)

Table 1 Parameters of regression equation ($n=11$)

Substance	Linear range/ (g/L)	Regression equation	r
VB ₁	$10^{-3} - 10^{-2}$	$I_{VB_1} = 8.87 \times 10^3 C + 5.97$	0.989 1
	$10^{-2} - 10^{-1}$	$I_{VB_1} = 8.75 \times 10^3 C + 1.08$	0.999 3
	$10^{-1} - 1.0$	$I_{VB_1} = 8.72 \times 10^3 C + 3.32$	0.998 8
VB ₂	$10^{-3} - 10^{-2}$	$I_{VB_2} = 1.74 \times 10^3 C + 1.12$	0.999 4
	$10^{-2} - 10^{-1}$	$I_{VB_2} = 1.48 \times 10^3 C + 3.91$	0.999 5

I : intensity; C : concentration, g/L.

2.4 干扰分析

在选定实验条件下,对含 1.0×10^{-2} g/L VB₁和VB₂的标准溶液进行了干扰研究,以误差小于5%为标准,1 000倍浓度的Na⁺,K⁺,Cl⁻,NO₃⁻,SO₄²⁻,Ca²⁺,Mg²⁺,Zn²⁺、葡萄糖、淀粉和200倍浓度的VB₆,VB₁₂、烟酰胺、右旋泛酸钙以及50倍浓度的V_C、叶酸和10倍浓度的V_A,V_D,V_E,I⁻不干扰测定。

2.5 样品分析

在选定的实验条件下,取20片复合维生素B片剂及单片剂,准确称量后,研细、混匀,称取质量相当于1片的研细粉末,用水溶解、过滤后,定容于50 mL棕色容量瓶中。按照图1所示进行样品分析,分析结果见表2。

表2 样品测定结果(测定值/标示值($\times 100\%$))($n=5$)

Table 2 Results of determination of VB tablets

[found (mg)/labeled (mg) $\times 100\%$] ($n=5$)

Sample batch No.	VB ₁	VB ₂	RSD	
			VB ₁	VB ₂
010973	99.3	102.5	1.21	1.83
93022	101.5	99.8	2.02	1.15
930802	106.1	93.2	2.38	2.67
010806	96.7	98.5	1.51	0.98
001212	95.8	-	0.97	1.85
990301	-	102.4	1.25	1.32
NJ07960	99.8	101.2	1.03	2.08

参考文献:

- [1] Yamaguchi M, Yoshida H, Nohta H. J Chromatogr A, 2002, 950(1-2): 1
- [2] Cui Hua, He Caixia, Zhao Guiwen. J Chromatogr A, 1999, 855(1): 171
- [3] Cui Hua, He Caixia, Zhao Guiwen. Chemical Journal of Chinese Universities, 2000, 21(6): 876
崔华,贺彩霞,赵贵文. 高等学校化学学报, 2000, 21(6): 876
- [4] Zhang Chengxiao, Zhou Guojun, Zhang Zhujun, Aizawa M. Anal Chim Acta, 1999, 394(2-3): 165
- [5] Chen Xi, Chen Wei, Wang Xiaoru. Acta Chimica Sinica, 2000, 58(5): 563
陈曦,陈薇,王小如. 化学学报, 2000, 58(5): 563
- [6] Grekas N, Calokerinos A C. Talanta, 1990, 37(11): 1 043
- [7] Song Z H, Wang L. Anal Lett, 2000, 33(13): 2 767
- [8] Zhang G F, Chen H Y. Anal Lett, 2000, 33(15): 3 285
- [9] Analytical Methods Committee. Analyst, 2000, 125(2): 353
- [10] Wang Xiuying. Chinese Journal of Chromatography, 1993, 11(6): 364
王秀英. 色谱, 1993, 11(6): 364
- [11] Li Zhengping, Zhang Zhujun, Wan Xiuqin. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 1995, 23(7): 751
李正平,章竹君,万秀琴. 分析化学, 1995, 23(7): 751